

# BREVET D'INVENTION

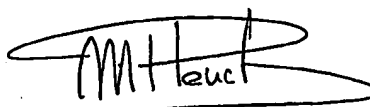
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 30 DEC. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

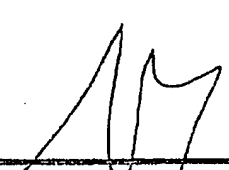


Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>19 DEC 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0216188</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>19 DEC. 2002</b> PAR L'INPI		<b>1</b> NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE  <b>BREESE-MAJEROWICZ</b> 3 avenue de l'Opéra 75001 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) 30185/FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2</b> NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
ou demande de certificat d'utilité initiale		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N° _____ Date _____	
<b>3</b> TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)  METHODE D'ANALYSE DE L'AGRESSIVITE TUMORALE DE CELLULES CANCEREUSES COMPRENANT LA MESURE DE LA QUANTITE D'ACTINE POLYMERISEE A L'ETAT STATIONNAIRE			
<b>4</b> DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5</b> DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		BIOALLIANCE PHARMA	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège		59 avenue du Général Martial Valin	
Rue			
Code postal et ville		75 015 PARIS	
Pays		France	
Nationalité		France	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			

REMISE DES PIÈCES DATE <b>19 DEC 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0216188</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 G W / 010801
<b>Vos références pour ce dossier :</b> <i>(facultatif)</i>		30185/FR	
<b>6 MANDATAIRE</b> <i>(s'il y a lieu)</i>			
Nom		MAJEROWICZ	
Prénom		Marc	
Cabinet ou Société		BREESE-MAJEROWICZ	
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel			
Adresse	Rue	3 avenue de l'Opéra	
	Code postal et ville	75 001 Paris	
	Pays	France	
N° de téléphone <i>(facultatif)</i>		01 47 03 67 77	
N° de télécopie <i>(facultatif)</i>		01 47 03 67 78	
Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		office@breese.fr	
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance <i>(en deux versements)</i>		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention <i>(joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence)</i> : AG <input type="text"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
<b>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)  MAJEROWICZ Marc  960703		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI  	

METHODE D'ANALYSE DE L'AGRESSIVITE TUMORALE DE  
CELLULES CANCEREUSES COMPRENANT LA MESURE DE LA QUANTITE  
D'ACTINE POLYMERISEE A L'ETAT STATIONNAIRE.

5           La présente invention a pour objet un test  
diagnostic ou prédictif dans le domaine du cancer. Plus  
particulièrement, l'invention se rapporte à une méthode  
basée sur la mesure directe de la quantité d'actine  
polymérisée à l'état stationnaire dans un lysat cellulaire  
10 non purifié, comme indicateur à la fois de l'agressivité  
tumorale et de la sensibilité au traitement anti-tumoral.

          Selon une forme de mise en œuvre préférée, la a  
méthode de l'invention est remarquable en ce que, à part  
l'extrait cellulaire et l'actine fluorescente, aucun ajout  
15 supplémentaire protéique purifié n'est nécessaire pour  
mettre en évidence une discrimination à la fois entre des  
cellules sensibles ou résistantes et des cellules à  
potentiel agressif ou non.

20           Le cytosquelette d'actine est une structure  
protéique essentielle à la survie cellulaire. Il permet  
notamment à la cellule de maintenir sa forme et son  
adhésion, de migrer, de communiquer avec les cellules  
adjacentes. Le cytosquelette est une structure extrêmement  
25 dynamique, en perpétuel remaniement.

          Les propriétés dynamiques du cytosquelette  
permettent à la cellule de communiquer avec l'environnement  
extérieur et de migrer pour former des métastases par  
exemple. Ces deux propriétés sont à l'origine de la  
30 cohésion tissulaire.

          Les propriétés dynamiques du cytosquelette rendent  
son étude extrêmement difficile.

          Il a été décrit dans l'art antérieur plusieurs  
mécanismes de régulation de la polymérisation de l'actine,

parmi lesquels on peut citer les mécanismes dépendant soit du complexe Arp2/3, soit faisant intervenir la famille de protéines reliées à Ena/VASP.

Ainsi, le complexe Arp2/3, constitué d'au moins  
 5 sept sous-unités protéiques, est régulé par les membres de la famille de protéines du syndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) pour activer la nucléation des filaments d'actine en structures en Y (Machesky, Mullins et al.1999).

Pour Ena/VASP, il s'agit de la famille des  
 10 protéines dont le prototype est la zyxine, parmi lesquelles on peut citer LPP (LIM-containing lipoma preferred partner), et TRIP6 (thiroid receptor-interacing protein-6), caractérisées en ce qu'elles possèdent un domaine riche en proline suivi par trois domaines LIM. Les protéines  
 15 appartenant à cette famille interagissent avec les protéines de la famille Ena/VASP parmi lesquelles on peut cite VASP (Vasodilator stimulated phosphoprotein), Ena (chez la drosophile), Mena (équivalent de la protéine Ena chez les mammifères) et Evl. Bien que ces deux dernières  
 20 familles de protéines soient clairement impliquées dans la régulation de ce mécanisme de polymérisation de l'actine, la séquence d'événements responsables n'est pas complètement élucidée (Fradelizi, Noireaux et al. 2001).

Il semble qu'une même cellule puisse contenir  
 25 plusieurs systèmes de polymérisation de l'actine, chacun étant responsable d'un type particulier de structure d'actine.

Les propriétés dynamiques du cytosquelette rendent son analyse extrêmement complexe, compte tenu des systèmes  
 30 protéiques différents intervenant dans les processus de régulation de la polymérisation et de la dépolymérisation de l'actine. Si les propriétés d'adhésion et de résistance sont liées (Damiano, Hazlehurst et al. 2001 ; dit Faute, Laurend et al. 2002), les propriétés invasives des cellules

cancéreuses diffèrent selon leur résistance aux traitements anti-cancéreux (Lopes, Ernst et al. 2002). In vivo, les cellules résistantes semblent avoir un pouvoir invasif plus grand (Mitsumoto, Kamura et al. 1998).

5           Ainsi, l'étude d'un seul des deux mécanismes dans un système purifié in vitro peut être incomplet pour juger du potentiel cellulaire de polymérisation de l'actine d'un extrait d'une lignée cellulaire ou d'un prélèvement biologique.

10

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de la présente invention ont maintenant mis en évidence une nette corrélation entre d'une part la mesure de la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire, et d'autre part  
15 l'agressivité tumorale.

La présente invention a donc pour but d'offrir une méthode simple et efficace de diagnostic ou de prédiction de l'agressivité tumorale et de la sensibilité au  
20 traitement anti-cancéreux chez un sujet. Ce but est atteint grâce à une méthode consistant à mesurer la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire dans un extrait cellulaire d'un prélèvement d'un sujet.

Plus particulièrement, l'invention a pour objet une  
25 méthode d'analyse de l'agressivité tumorale de cellules cancéreuses chez un sujet comprenant la mesure de la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire dans un extrait cellulaire du sujet.

Avantageusement, l'extrait cellulaire est un lysat  
30 desdites cellules cancéreuses.

On entend par agressivité tumorale le caractère invasif d'un cancer ou d'une lignée cellulaire cancéreuse, c'est-à-dire aussi bien le potentiel métastatique de ceux-ci que la rapidité avec laquelle une tumeur primitive se

développe et croît. On entend également par agressivité tumorale, la tumorigénicité, c'est-à-dire la capacité d'une lignée cellulaire à entraîner plus ou moins efficacement l'apparition d'une tumeur après injection en sous cutanée  
5 dans un modèle murin apte à recevoir cette lignée. On entend aussi par agressivité tumorale l'absence de sensibilité au traitement anti-cancéreux.

La mesure réalisée sur l'extrait cellulaire du  
10 sujet est comparée à une ou plusieurs valeurs de référence spécifiques du tissu analysé dans le cas de prélèvements biologiques, ou spécifiques du phénotype, dans le cas de lignées cellulaires.

15 La quantité d'actine polymérisée correspond à la somme de toute l'actine sous forme F. Cette somme dépend de la quantité totale d'actine, quelle que soit sa forme, forme F ou forme G, mais surtout de l'ensemble des mécanismes de régulation de la polymérisation et de la  
20 dépolymérisation.

On entend par actine F les polymères plus ou moins longs d'actine globulaire (actine G). La formation d'actine F est un phénomène dynamique, très précisément régulé par plusieurs mécanismes différents. L'actine F peut subir de  
25 manière concomitante un phénomène de polymérisation d'actine globulaire à une extrémité du filament et un phénomène de dépolymérisation à l'autre extrémité.

Un but de la présente invention est de s'affranchir  
30 des différentes voies de régulation de la polymérisation de l'actine, en utilisant un système intégré.

Ce but est atteint selon l'invention, grâce à la mesure de la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire, laquelle prend en compte la résultante de

tous les mécanismes de régulation de la polymérisation et de la dépolymérisation des filaments d'actine, et plus précisément, aussi bien les mécanismes de stimulation que les mécanismes d'inhibition de la polymérisation et de la  
5 dépolymérisation. L'état stationnaire résulte de l'équilibre entre tous ces mécanismes de régulation de la polymérisation de l'actine à une extrémité du filament d'actine et de la dépolymérisation à l'autre extrémité.

De façon avantageuse, la mesure de l'actine  
10 polymérisée à l'état stationnaire ne nécessite pas une mesure d'expression d'une protéine (par exemple la zyxine ou l'une des protéines du complexe Arp2/3 ou l'une des protéines de la famille Ena/VASP) et ne nécessite pas d'étape de purification protéique ou l'ajout de réactifs  
15 solides (par exemple des billes).

La présente invention permet de mesurer la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire d'un extrait cellulaire non purifié, où toutes les voies d'activation/inhibition des processus de polymérisation et  
20 dépolymérisation de l'actine sont intégrées.

Ainsi, on entend par quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire, la quantité d'actine polymérisée lorsque l'équilibre entre la polymérisation de l'actine à une extrémité des filaments et la dépolymérisation à  
25 l'autre extrémité est atteint. Comme indiqué précédemment, l'état stationnaire est la résultante de toutes les voies de régulation de la polymérisation de l'actine.

La mesure de la quantité d'actine à l'état stationnaire peut être réalisée par toute technique connue  
30 de l'homme du métier, comme par exemple la technique de polarisation statique de fluorescence aussi appelée anisotropie statique de fluorescence.

L'anisotropie et la polarisation sont deux valeurs reliées mathématiquement et donc facilement



interchangeables. Elles décrivent le même phénomène. La polarisation de fluorescence permet d'étudier les interactions entre molécules en mesurant les changements de taille de molécules fluorescentes en solution. Cette mesure  
5 est corrélée à la taille de la molécule fluorescente ou du complexe moléculaire fluorescent. En l'occurrence, la molécule fluorescente est un monomère d'actine (ou actine G) lié à un fluorochrome, en l'occurrence l'Alexa 488, qui est incorporé dans les filaments d'actine (actine F) au  
10 cours de la polymérisation.

Ainsi, selon une forme toute préférée de réalisation, la mesure de la quantité d'actine à l'état stationnaire de la méthode d'analyse de l'invention est réalisée par polarisation statique de fluorescence en  
15 présence de monomères d'actine liés à un fluorochrome, lesquels sont incorporés dans les filaments d'actine (actine F) formés au cours de la polymérisation de l'actine endogène du lysat.

Dans cette forme de réalisation, les monomères  
20 d'actine liés à un fluorochrome sont ajoutés au lysat cellulaire dans un rapport compris entre  $1/80^e$  et  $1/1600^e$  par rapport à la quantité d'actine endogène.

Le résultat du test est une valeur d'anisotropie de  
25 fluorescence au plateau (« STAFI ») correspondant à la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire et une constante apparente ( $K_{obs}$ ) de polymérisation de l'actine résultant de l'incorporation progressive des monomères d'actine marquées au cours du temps jusqu'à atteindre  
30 l'état stationnaire, c'est-à-dire le plateau de la courbe.

Grâce au logiciel GraphPad Prism® version 3 (GraphPad Software Inc.), les données expérimentales permettent de générer une courbe ajustée à une équation d'ordre 1 telle que :

$$Y = \Delta mA \max (1 - e^{-K \cdot t}) \text{ où}$$

$Y$  = la valeur d'anisotropie mesurée à un temps  $t$

$\Delta mA \max$  = « STAFI », la valeur d'ordonnée maximum à l'équilibre

- 5             $K$  = la constante  $K_{obs}$   
               $t$  = le temps en secondes

Pour prédire un niveau d'agressivité tumorale et de sensibilité à un traitement anti-cancéreux, ces deux  
 10 valeurs doivent être comparées à des valeurs de référence soit spécifiques du tissu analysé dans le cas de prélèvements biologiques, soit spécifiques du phénotype, dans le cas de lignées cellulaires.

Un échantillon provenant d'un prélèvement de cancer  
 15 très agressif, c'est-à-dire présentant soit un caractère invasif soit un caractère tumorigène ou bien encore ayant perdu le caractère de sensibilité aux traitements anti-cancéreux, présentera un STAFI et un  $K_{obs}$  plus faibles que la valeur de référence, c'est-à-dire la valeur obtenue à  
 20 partir de prélèvements similaires peu ou pas agressifs.

Par exemple, la valeur normale d'anisotropie de fluorescence au plateau (« STAFI » =  $\Delta mA \max$ ) d'une lignée peu invasive de mélanome (B16F0) est 47mA ( $K_{obs} = 0,07$ ). Une lignée dérivée de celle-ci, décrite par ailleurs  
 25 comme très invasive (B16F10) (Nakamura, Yoshikawa et al. 2002), présente une valeur de STAFI de 37 mA ( $K_{obs} = 0,02$ ), nettement inférieure à la valeur des B16F0. Les valeurs de STAFI et de  $K_{obs}$  obtenues à partir de lysats de cellules invasives sont nettement inférieures aux valeurs de la  
 30 lignée de référence (figure 3).

Un autre exemple est la comparaison de la valeur du STAFI de lignées tumorigènes avec la valeur obtenue à partir de lignées cellulaires parentales non tumorigènes prises comme référence. La valeur du STAFI des lignées

tumorigènes est nettement inférieure aux valeurs des lignées de référence non tumorigènes.

Dans l'exemple des lignées dérivées de NIH 3T3, le STAFI de la lignée tumorigène (NIH 3T3 EF) est égal à 35mA  
5 comparé aux lignées de référence non tumorigènes (NIH 3T3 et NIH 3T3 EF zyxine) pour lesquelles le STAFI est égal à 65 et 57 mA respectivement (figure 1).

La lignée tumorigène BAF3 bcr-abl et la lignée non tumorigène BAF3 présentent des valeurs de STAFI de 40mA et  
10 58mA respectivement. La répression de l'expression de l'oncogène de fusion, responsable de la tumorigénicité de la lignée BAF3 bcr-abl, induit la restauration de la valeur du STAFI à une valeur proche du STAFI de la lignée de référence soit 52mA et 58mA respectivement (figure 2).

15 Un dernier exemple est la comparaison de la valeur de STAFI de lignées cellulaires de cancer du sein plus ou moins sensibles au traitement anticancéreux. Les valeurs de STAFI des deux lignées résistantes (MCF7-MDR et MCF7-dox) sont nettement inférieures à la valeur de la lignée  
20 sensible (MCF7) prise comme référence soit 35mA et 52mA versus 71mA (figure 4).

Un exemple préféré de mise en œuvre de la méthode selon l'invention comprend les étapes  
25 suivantes :

- la lyse des cellules cancéreuses dans des conditions non-dénaturantes pour les protéines et l'élimination des débris cellulaires,
- le dosage des protéines totales du lysat,
- 30 - l'ajout de monomères d'actine liés à un fluorochrome,
- l'ajout des substances nécessaires à la polymérisation de l'actine endogène et à la protection des protéines du lysat,

- la mesure de la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire dans le lysat.

La présente invention vise aussi à offrir une  
5 méthode d'identification de molécules susceptibles de  
présenter une activité anticancéreuse. Une telle méthode  
comprend la mise en œuvre de la méthode d'analyse de  
l'agressivité tumorale décrite précédemment selon l'une  
quelconque des revendications 1 à 6 en présence d'une  
10 quantité adéquate d'une ou plusieurs molécules à tester, et  
la détermination de la capacité de ladite molécule à  
restaurer une quantité d'actine polymérisée à l'état  
stationnaire correspondant à celle de cellules non  
agressives.

15 Les travaux réalisés dans le cadre de la présente  
invention ont permis l'identification de molécules capables  
de restaurer la valeur du STAFI de cellules agressives au  
niveau de celle de cellules non agressives. Ces molécules  
sont susceptibles de présenter une activité anti-  
20 cancéreuse.

Par exemple, la Jasplakinolide, ajoutée dans le  
lysate de cellules agressives (NIH 3T3 EF) juste au moment  
du test, permet la restauration de la valeur du STAFI de  
ces cellules à une valeur proche de celle du STAFI de  
25 cellules de référence non tumorigènes (NIH 3T3) (figure 5).  
Le tableau 1 ci-dessous rapporte la restauration de la  
valeur de  $\Delta$  mA max (STAFI, correspondant à la quantité  
d'actine polymérisée à l'état stationnaire) de cellules  
tumorigènes (NIH 3T3 EF, notées EF) au niveau de la valeur  
30 de cellules non tumorigènes (NIH 3T3) par l'ajout de la  
jasplakinolide (notée jaspla).

Tableau 1

Lignées cellulaires	$\Delta mA$ max
NIH 3T3 EF	30
NIH 3T3	62
NIH 3T3 EF + Jasplakinolide	65

L'invention concerne encore l'application de la  
 5 méthode d'analyse de l'agressivité tumorale décrite  
 précédemment à :

- l'évaluation du caractère invasif desdites  
 cellules ;
- l'évaluation de la tumorigénicité des cellules ;
- 10 - la prédiction de la sensibilité desdites  
 cellules à un traitement anti-cancéreux ; le traitement  
 anti-cancéreux consiste par exemple en une radiothérapie ou  
 une chimiothérapie.

On entend par sensibilité au traitement anti-  
 15 cancéreux aussi bien l'absence de résistance aux  
 médicaments dépendant du système MDR (multi drug  
 resistance) liée aux mécanismes de pompes de la famille de  
 protéines P-gp, que la capacité des cellules cancéreuses à  
 entrer en apoptose. Ces deux phénomènes peuvent être en  
 20 réponse à un traitement anti-cancéreux consistant en une  
 radiothérapie ou une chimiothérapie.

L'invention vise également un kit pour un test  
 diagnostique ou prédictif de l'agressivité tumorale, et plus  
 25 spécialement pour la mesure de la quantité d'actine  
 polymérisée à l'état stationnaire pour l'évaluation de  
 l'agressivité tumorale dans un prélèvement biologique.

Un tel kit comprend :

- un milieu de re-suspension des cellules pour la lyse des cellules,
- les substances nécessaires à la polymérisation de l'actine endogène et à la protection des protéines du lysat,
- les monomères d'actine liés à un fluorochrome,
- un tampon de polymérisation de l'actine,
- un tampon général de l'actine,
- éventuellement des extraits de référence de cellules agressives et non agressives.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent dans lesquels il sera fait référence aux dessins en annexe où :

- La figure 1 illustre la mesure de la polymérisation de l'actine à l'état stationnaire (STAFI =  $\Delta$  mA max) dans des lignées cellulaires parentales adhérentes murines, non tumorigènes (NIH 3T3 et NIH 3T3 EF: zyxine) et tumorigène (NIH 3T3 EF).
- La figure 2 illustre la mesure de la polymérisation de l'actine à l'état stationnaire (STAFI =  $\Delta$  mA max) dans des lignées cellulaires parentales non adhérentes (cellules hématopoïétiques murines), non tumorales (BAF3 et BAF3 Bcr-Abl<sup>-</sup>) et tumorale (BAF3 Bcr-Abl<sup>+</sup>).
- La figure 3 illustre la mesure de la polymérisation de l'actine à l'état stationnaire (STAFI =  $\Delta$  mA max) dans des lignées cellulaires parentales de carcinome du sein, sensible (MCF7) et résistantes (MCF7-Doxorubicine et MCF7-MDR).
- La figure 4 illustre la mesure de la polymérisation de l'actine à l'état stationnaire (STAFI =  $\Delta$  mA max) dans des lignées cellulaires parentales de

mélanome, ayant un potentiel plus ou moins métastatique (B16F0 < B16F10).

- La figure 5 illustre l'identification d'une molécule (la jasplakinolide) capable de restaurer la  
 5 quantité d'actine à l'état stationnaire (STAFI =  $\Delta$  mA max) d'une lignée tumorigène au niveau de la quantité d'une lignée non tumorigène.

### I - Méthodes.

10 La technique de polarisation de fluorescence aussi appelée anisotropie statique de fluorescence permet d'obtenir une valeur dépendant de la taille de la molécule fluorescente et du nombre de complexes moléculaires fluorescents. C'est-à-dire qu'en ajoutant une faible  
 15 proportion d'actine monomérique fluorescente dans un extrait cellulaire, ces monomères vont être incorporés dans le filament d'actine au cours de la polymérisation ce qui va entraîner une augmentation de la valeur d'anisotropie jusqu'à un plateau apparent, correspondant à l'équilibre  
 20 entre la polymérisation et la dépolymérisation des filaments d'actine contenant des monomères fluorescents. Le niveau de ce plateau, appelé « STAFI », reflète la quantité d'actine F à l'état stationnaire, c'est-à-dire le potentiel adhésif de la cellule, et la vitesse d'obtention  
 25 du plateau dépend de la rapidité avec laquelle ces filaments se forment. Ces deux paramètres sont des index de l'agressivité tumorale.

Méthode de lyse des cellules : Pour les cellules en culture, les cellules peuvent devoir être trypsinées avant  
 30 d'être lavées (tampon de lavage : 135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EGTA, 5.5 mM glucose, 0.3 % albumine, pH=6,5). Les cellules sont mises en suspension dans un tampon de sonication (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EGTA et 2 mM MgCl<sub>2</sub> + inhibiteurs de

protéases Roche) à raison de  $50 \cdot 10^6$  cellules/ml puis soniquées sur glace, à raison de 10 runs de 10 secondes espacés de temps de pause de 30 secondes. Le lysat est centrifugé 30 min à 8000 rpm à 4 °C puis filtré sur 0.45  $\mu$ m. La concentration en protéines totales du lysat est mesurée par la méthode de Bradford pour être ajustée à 2mg/ml avec du tampon de sonication. 0,4mM final d'ATP et de DTT sont ajoutés pour constituer le lysat cellulaire à tester.

La solution de monomères d'actine liés à un fluorochrome est préparée de la manière suivante : la solution stock d'actine-Alexa 488 (Molecular Probes) (7,3 mg/ml) est diluée au 1:200e dans du tampon G (5 mM Tris pH8,1, 0,2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,2 mM DTT, 0,2 mM ATP) supplémenté par 10% de sucrose puis ultracentrifugée à 35 000 rpm, 120 min, à 4°C afin d'éliminer d'éventuels filaments d'actine. Cette solution de monomères d'actine marqués est conservée à - 80°C en aliquots.

Au moment du test, la solution de monomères d'actine marqués est diluée au 1/3 dans du tampon G. L'appareil utilisé est un Beacon 2000. Introduire dans un tube pour Beacon, 167  $\mu$ l de tampon G et 3  $\mu$ l de solution de monomères d'actine marqués préalablement dilué. Après stabilisation de la valeur d'anisotropie des monomères d'actine à environ 110 mA, ajouter 4  $\mu$ l de tampon de polymérisation (2,5 M KCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 25 mM ATP) et 20  $\mu$ l d'extrait cellulaire à tester à 2 mg/ml. La valeur d'anisotropie de fluorescence est enregistrée pendant une période d'environ 200 secondes. Les données sont traitées avec le logiciel GraphPad Prism version 3.0 (Ed. GraphPad Software). La valeur d'anisotropie de fluorescence des monomères d'actine marqués seuls (environ 110mA) est retranchée des valeurs suivantes.



L'ensemble des lignées cellulaires est cultivé à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont entretenues dans du milieu DMEM ou RPMI (Gibco) supplémenté par 10% de sérum de veau nouveau-né ou de sérum de veau  
 5 fœtal (Gibco) et d'antibiotiques (pénicilline à 100UI/mL et streptomycine à 100µg/mL).

La lignée NIH-3T3 est une lignée de fibroblastes murins non tumorigènes.

La lignée NIH-3T3-EF est une lignée tumorale  
 10 dérivée de la précédente et contient un ADNc codant pour l'oncogène de fusion EWS-FLI dans son génome. L'expression de cette protéine est sélectionnée à l'aide de 2,5µg/mL de puromycine.

La lignée NIH-3T3-EF-zyxine est une lignée dérivée  
 15 de la précédente, qui a perdu son caractère tumorigène suite à la transformation par un ADNc codant pour la protéine zyxine humaine. L'expression de cette protéine est sélectionnée à l'aide de la généticine.

La lignée BAF3 est une lignée pré-lymphocytaire  
 20 murine. Elle est entretenue en présence d'IL3.

La lignée BAF3 Bcr-Abl est une lignée dérivée de la précédente, contenant un ADNc codant pour l'oncogène de fusion Bcr-Abl, dont l'expression peut être réprimée par la doxycycline. Lorsque cette lignée est cultivée en l'absence  
 25 de doxycycline et d'IL3, l'oncogène est exprimé et elle est alors notée BAF3 bcr-abl<sup>+</sup>. Lorsque cette lignée est cultivée en présence de doxycycline et d'IL3, l'oncogène de fusion n'est plus exprimé et elle est notée BAF3 bcr-abl<sup>-</sup> (Dugray, Geay et al. 2001).

30 La lignée B16F0 est une lignée de mélanome murin ayant un faible potentiel métastatique (Nakamura, Yoshikawa et al. 2002).

La lignée B16F10 est une lignée dérivée de la précédente, ayant acquis un fort potentiel métastatique à

la suite de 10 sélections successives dans un modèle murin syngénique de métastases pulmonaires (Nakamura, Yoshikawa et al. 2002).

La lignée MCF7 est une lignée de carcinome mammaire humain faiblement tumorigène.

La lignée MCF7-Dox est une lignée dérivée de la précédente, rendue résistante à la doxorubicine par ajout régulier de 10 $\mu$ M de doxorubicine dans le milieu de culture.

La lignée MCF7-MDR est une lignée dérivée de la lignée MCF7, contenant un ADNc codant pour la P-gp, responsable de la perte de la sensibilité à la chimiothérapie des cellules cancéreuses.

## II - Résultats.

15

1) Corrélation entre la tumorigénicité de lignées cellulaires adhérentes de fibroblastes murins et les valeurs mesurées de STAFI et  $K_{obs}$ .

La figure 1 représente la détermination de la valeur de delta mA max (STAFI, correspondant à la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire) dans trois lignées cellulaires parentales murines adhérentes, non tumorigènes (NIH 3T3 et NIH 3T3 EF zyxine) et tumorigènes (NIH 3T3 EF). Le tableau 2 ci-dessous rapporte la cinétique de polymérisation de l'actine en présence d'extraits cellulaires par polarisation statique de fluorescence.

Tableau 2

Lignées cellulaires	Delta mA max	Kobs
NIH 3T3	65	0,086
NIH 3T3 EF	35	0,04
NIH 3T3 zyxine	57	0,033

La quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire (« STAFI » : valeur d'anisotropie de fluorescence au plateau) de la lignée tumorigène (NIH 3T3 EF) est comparée à celle de la lignée parentale non tumorigène (NIH 3T3) (figure 1). Le delta mA max (SATFI) de la lignée tumorigène (NIH 3T3 EF) est nettement inférieur au delta mA max de la lignée non tumorigène (NIH 3T3), soit 35 et 65 respectivement.

L'expression de la zyxine dans la lignée tumorigène NIH 3T3 EF conduit à une importante diminution de la tumorigénicité de cette lignée (NIH 3T3 EF Zyxine). La diminution de la tumorigénicité de cette lignée est corrélée avec la restauration du delta mA max à une valeur proche de celle de la lignée de référence, en l'occurrence la lignée NIH 3T3, soit 57 et 65 respectivement.

2) Corrélation entre la tumorigénicité de lignées cellulaires pré-lymphocytaires murines non adhérentes et les valeurs mesurées de STAFI et  $K_{obs}$ .

La figure 2 représente la détermination de la valeur de delta mA max (STAFI, correspondant à la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire) dans différentes lignées cellulaires non adhérentes, non tumorigènes (BAF3 parentales, BAF3 Bcr-Abl<sup>-</sup>) et tumorigène (BAF3 Bcr-Abl<sup>+</sup>). Le tableau 3 rapporte la cinétique de polymérisation de l'actine en présence d'extraits cellulaires par polarisation statique de fluorescence.

Tableau 3

Lignées cellulaires	Delta mA max	Kobs
BAF3 parentales	58	0,12
BAF3 Bcr-Abl <sup>+</sup>	40	0,05
Bcr-Abl <sup>-</sup>	52	0,101

La quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire (« STAFI » : valeur d'anisotropie de fluorescence au plateau, c'est-à-dire la valeur de  $\Delta m$  maximum) de la lignée tumorigène BAF3 Bcr-Abl<sup>+</sup>, transformée par l'oncogène de fusion Bcr-Abl, est comparée à celle de la lignée parentale non tumorigène (BAF3) (figure 2) (Dugray, Geay et al. 2001). Pour la lignée tumorigène (BAF3 Bcr-Abl<sup>+</sup>), le  $\Delta m$  max est nettement inférieur au  $\Delta m$  max de la lignée non tumorigène (BAF3), soit 40 et 58 respectivement.

La même observation est faite pour la vitesse de polymérisation de l'actine, représentée par la constante  $K_{obs}$ . Pour la lignée tumorigène (BAF3 Bcr-Abl<sup>+</sup>),  $K_{obs}$  est nettement inférieur au  $K_{obs}$  de la lignée non tumorigène (BAF3), soit 0,05 et 0,12 respectivement.

La répression de l'expression de l'oncogène de fusion par la doxycycline dans la lignée BAF3 Bcr-Abl<sup>+</sup> conduit à la perte de la tumorigénicité de cette lignée (Dugray, Geay et al. 2001). La répression de l'expression de l'oncogène restaure le  $\Delta m$  max de cette lignée tumorigène à une valeur proche de celle de la lignée non tumorigène de référence, soit 52 et 58 respectivement.

### 3) Corrélation entre la sensibilité à un traitement anti-cancéreux de lignées de carcinome mammaire humain et les valeurs mesurées de STAFI et $K_{obs}$

La figure 3 représente la détermination de la valeur de  $\Delta m$  max (STAFI, correspondant à la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire) dans deux lignées cellulaires de mélanomes parentales, ayant un potentiel plus ou moins métastatique (B16F0 < B16F10). Le tableau 4 ci-dessous rapporte la cinétique de polymérisation de l'actine en présence d'extraits cellulaires par polarisation statique de fluorescence.

Tableau 4

Lignées cellulaires	Delta mA max	Kobs
B16F0	47	0,071
B16F10	37	0,028

La quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire (« STAFI » : valeur d'anisotropie de fluorescence au plateau, c'est-à-dire la valeur de delta mA maximum) de la lignée MCF7-Dox, résistante à la doxorubicine, est comparée à celle de la lignée parentale sensible (MCF7) (figure 3). Pour la lignée résistante (MCF7-Dox), le delta mA max est nettement inférieur au delta mA max de la lignée sensible (MCF7), soit 52mA et 71mA respectivement.

De plus, la valeur de delta mA max de la lignée résistante MCF7-MDR, transfectées par le gène codant pour la P-gp, est également comparée à la valeur de la lignée sensible (MCF7). Pour la lignée résistante (MCF7-MDR), la delta mA max est également très nettement inférieur au delta mA max de la lignée sensible (MCF7), soit 35 et 71 respectivement.

20

#### 4) Corrélacion entre le potentiel métastatique de lignées cellulaires de mélanome murin (B16F0 et B16F10) et les valeurs mesurées de STAFI et $K_{obs}$

La figure 4 représente la détermination de la valeur de delta mA max (STAFI, correspondant à la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire) dans différentes lignées cellulaires adhérentes, sensibles (MCF7) et résistantes (MCF7 Dox et MCF7 MDR) à un traitement anticancéreux. Le tableau 5 ci-dessous rapporte la cinétique de polymérisation de l'actine en présence

30

d'extraits cellulaires par polarisation statique de fluorescence.

Tableau 5

5

Lignées cellulaires	Delta mA max	Kobs
MCF7	71	0,0034
MCF7-Doxorubicine	52	0,0034
MCF7 MDR	35	0,071

La quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire (« STAFI » : valeur d'anisotropie de fluorescence au plateau, c'est-à-dire la valeur de delta mA maximum) de la lignée B16F10, sélectionnée pour son potentiel métastatique à partir de la lignée B16F0 (Nakamura, Yoshikawa et al. 2002), est comparée à celle de la lignée parentale moins métastatique (B16F0) (figure 4). Pour la lignée la plus agressive (B16F10), le delta mA max est nettement inférieur au delta mA max de la lignée non tumorigène (B16F0), soit 37 et 47 respectivement.

La même observation est faite pour la vitesse de polymérisation de l'actine, représentée par la constante  $K_{obs}$ . Pour la lignée la plus agressive (B16F10),  $K_{obs}$  est nettement inférieur au  $K_{obs}$  de la lignée la moins agressive (B16F0), soit 0,028 et 0,071 respectivement.

#### 5) Identification de la jasplakinolide comme molécule restaurant le potentiel de polymérisation de l'actine à l'état stationnaire.

La figure 5 représente la restauration de la valeur de delta mA max (STAFI, correspondant à la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire) de cellules tumorigènes (NIH 3T3 EF, notées EF) au niveau de la valeur

de cellules non tumorigènes (NIH 3T3) par l'ajout de la jasplakinolide (notée jaspla)

La quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire (« STAFI » : valeur d'anisotropie de fluorescence au plateau, c'est-à-dire la valeur de  $\Delta F$  maximum) de cellules tumorigènes (NIH 3T3 EF, notée EF) a été mesurée après ajout de  $10\mu\text{M}$  de jasplakinolide dans le milieu de polymérisation. Le  $\Delta F$  max des cellules tumorales déterminé à une valeur initiale de  $35\text{mM}$  est restauré par l'ajout de jasplakinolide à une valeur proche de celle de la lignée non tumorigène (NIH 3T3),  $66\text{mM}$  et  $65\text{mM}$  respectivement.

La même observation est faite pour la vitesse de polymérisation de l'actine, représentée par la constante. La jasplakinolide restaure le  $K_{\text{obs}}$  d'une valeur égale à  $0,04$  vers une valeur qui est proche de la valeur obtenue avec les cellules non tumorigènes, soit  $0,15$  et  $0,086$  respectivement.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Damiano, J. S., L. A. Hazlehurst, et al. (2001).  
 "Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects  
 5 the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from  
 apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs,  
 and gamma-irradiation." Leukemia 15(8): 1232-9.
- 2) dit Faute, M. A., L. Laurent, et al. (2002).  
 "Distinctive alterations of invasiveness, drug resistance  
 10 and cell-cell organization in 3D-cultures of MCF-7, a human  
 breast cancer cell line, and its multidrug resistant  
 variant." Clin Exp Metastasis 19(2): 161-8.
- 3) Dugray, A., J.F., Geay, et al. (2001). "Rapid  
 generation of a tetracycline-inducible BCR-ABL defective  
 15 retrovirus using a single autoregulatory retroviral  
 cassette." Leukemia 15: 1658-62.
- 4) Fradelizi, J., V. Noireaux, et al. (2001). "ActA  
 and human zyxin harbour Arp2/3-independent actin-  
 polymerization activity." Nat Cell Biol 3(8): 699-707.
- 20 5) Lopes, E. C., G. Ernst, et al. (2002).  
 "Dissimilar invasive and metastatic behavior of vincristine  
 and doxorubicin-resistant cell lines derived from a murine  
 T cell lymphoid leukemia." Clin Exp Metastasis 19(4): 283-  
 90.
- 25 6) Machesky, L. M., R. D. Mullins, et al. (1999).  
 "Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of  
 actin filaments by the Arp2/3 complex." Proc Natl Acad Sci  
U S A 96(7): 3739-44.
- 30 7) Mitsumoto, M., T. Kamura, et al. (1998).  
 "Emergence of higher levels of invasive and metastatic  
 properties in the drug resistant cancer cell lines after  
 the repeated administration of cisplatin in tumor-bearing  
 mice." J Cancer Res Clin Oncol 124(11): 607-14.



8) Nakamura, K., N. Yoshikawa, et al. (2002).  
"Characterization of mouse melanoma cell lines by their  
mortal malignancy using an experimental metastatic model."  
Life Sci 70(7): 791-8.

## REVENDICATIONS

1) Méthode d'analyse de l'agressivité tumorale de cellules cancéreuses comprenant la mesure de la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire dans un lysat desdites cellules.

2) Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la mesure réalisée sur lysat est comparée à une ou plusieurs valeurs de référence de la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire soit dans des cellules en culture spécifiques d'un phénotype soit dans des tissus provenant de prélèvements biologiques.

3) Méthode selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la quantité d'actine polymérisée correspond à la somme de toute l'actine sous forme F.

4) Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la mesure de la quantité d'actine à l'état stationnaire est réalisée par polarisation statique de fluorescence en présence de monomères d'actine liés à un fluorochrome, lesquels sont incorporés dans les filaments d'actine (actine F) formés au cours de la polymérisation de l'actine endogène du lysat.

5) Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que les monomères d'actine liés à un fluorochrome sont ajoutés au lysat cellulaire dans un rapport compris entre  $1/80^e$  et  $1/1600^e$  par rapport à la quantité d'actine endogène.

6) Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- la lyse des cellules cancéreuses dans des conditions non-dénaturantes pour les protéines et l'élimination des débris cellulaires,
- le dosage des protéines totales du lysat,
- l'ajout de monomères d'actine liés à un fluorochrome,
- l'ajout des substances nécessaires à la polymérisation de l'actine endogène et à la protection des protéines du lysat,
- la mesure de la quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire dans le lysat.

15

7) Méthode d'identification de molécules susceptibles de présenter une activité anti-cancéreuse, caractérisée en ce qu'elle comprend la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 en présence d'une quantité adéquate de ladite molécule, et en ce que l'on détermine la capacité de ladite substance à restaurer une quantité d'actine polymérisée à l'état stationnaire correspondant à celle de cellules non agressives.

25

8) Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, à l'évaluation du caractère invasif desdites cellules.

30

9) Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, à l'évaluation de la tumorigénicité desdites cellules.

10) Application de la méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, à la prédiction de la sensibilité desdites cellules à un traitement anti-cancéreux.

5

11) Application selon la revendication 10, caractérisée en ce que ledit traitement anti-cancéreux consiste en une radiothérapie ou une chimiothérapie.

10

12) Un kit pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un milieu de re-suspension des cellules pour la lyse des cellules,

15

- les substances nécessaires à la polymérisation de l'actine endogène et à la protection des protéines du lysat,

- une solution de monomères d'actine liés à un fluorochrome,

20

- un tampon de polymérisation de l'actine,

- un tampon général d'actine,

- éventuellement des extraits de référence de cellules agressives et non agressives.

Figure 1

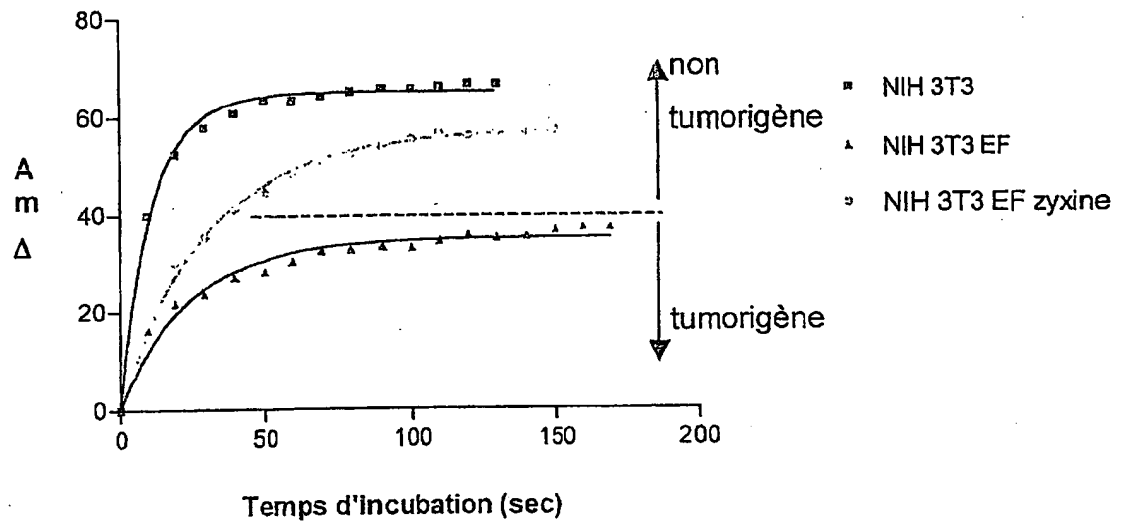


Figure 2

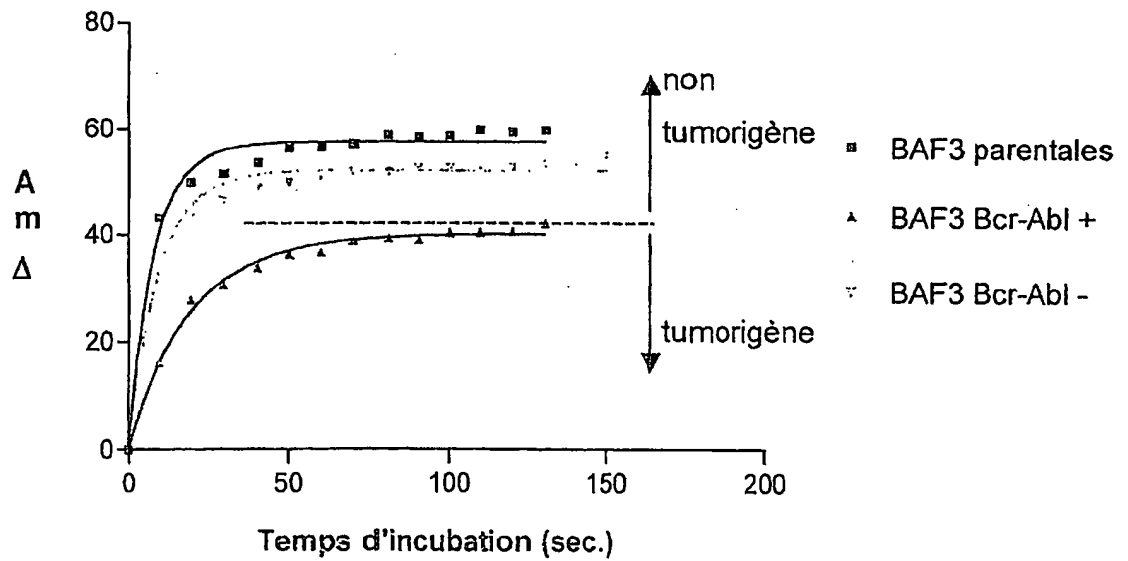


Figure 3

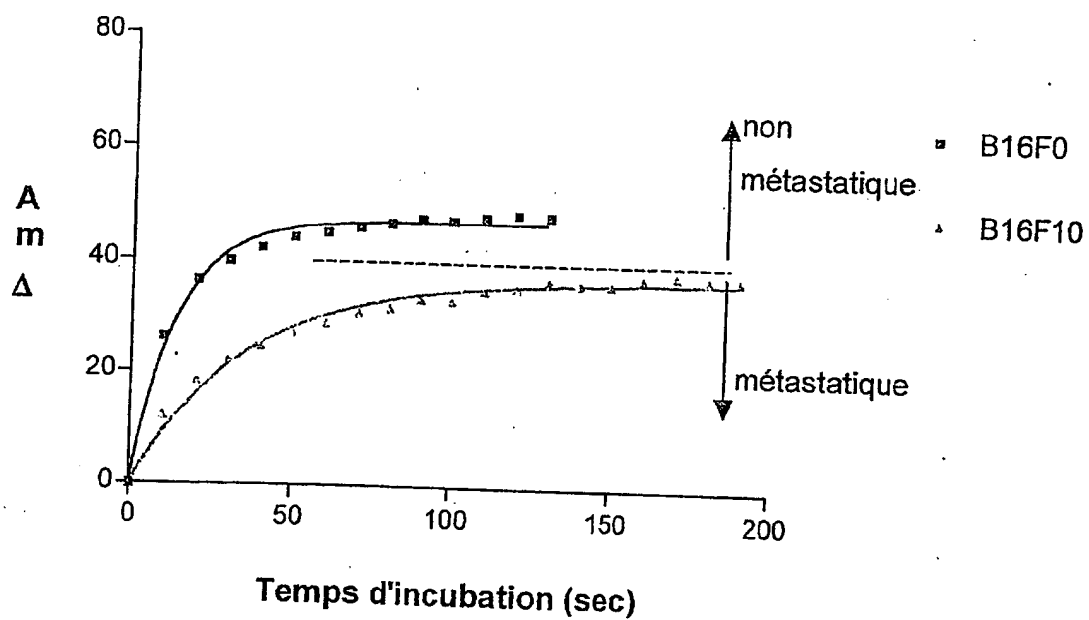


Figure 4

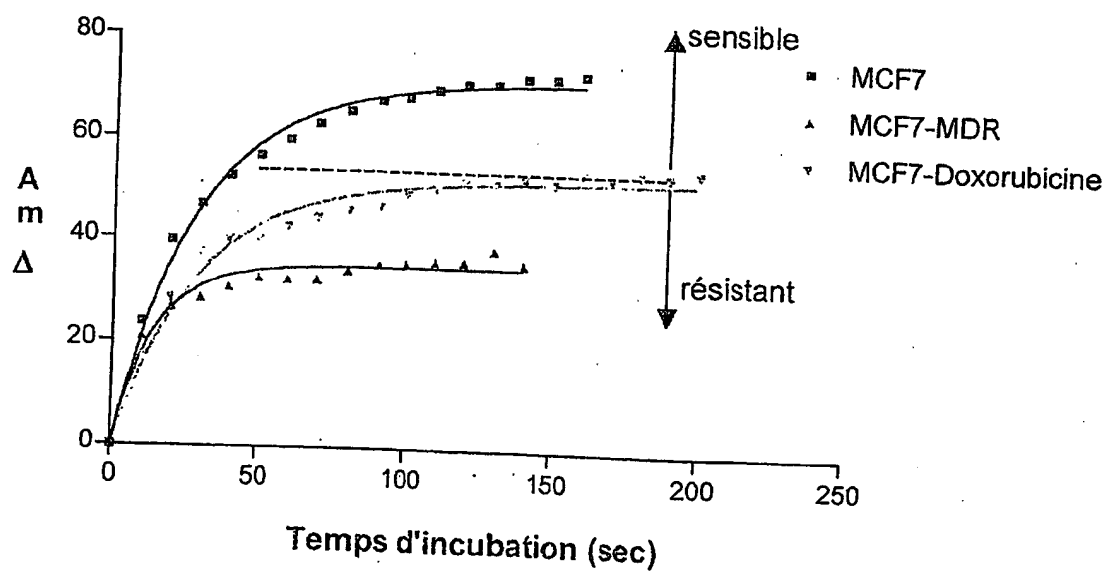
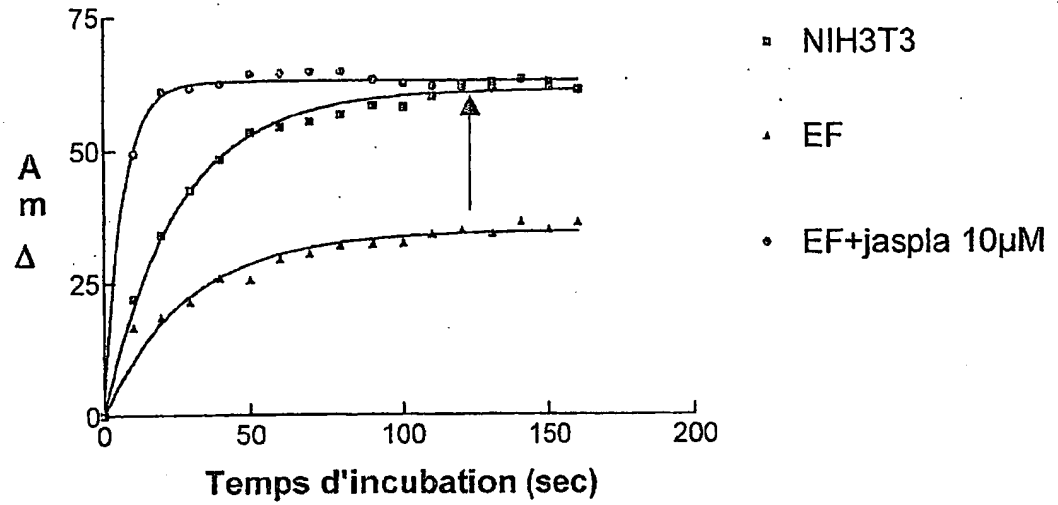


Figure 5



PCT Application  
PCT/FR2003/003802





**Martin, Paul C.**

---

**From:** Weber, Jon  
**Sent:** Thursday, November 09, 2006 1:43 PM  
**To:** Carlson, Karen; Desai, Anand; Gebreyesus, Kagne H.; Kam, Chih-Min (AU1653); Kim, Alexander D.; Lee, Jae W.; Liu, Samuel; Mitra, Rita; Monshipouri, Maryam; Moore, William; Nashed, Nashaat; Noakes, Suzanne Marie; Rooke, Agnes Beata; Schnizer, Holly; Steadman, David; Tsay, Marsha M.; Wax, Robert; Afremova, Vera; Gitomer, Ralph; Gough, Tiffany M.; Lilling, Herbert J.; Martin, Paul C.; Naff, David; Petersen, Clark D.; Schuberg, Laura J.; Shen, Bin; Singh, Satyendra; Srivastava, Kailash; Wood, Amanda J.; Achutamurthy, Ponnathapu; Kerr, Kathleen; McKelvey, Terry; Tsang, Cecilia; Wityshyn, Michael  
**Subject:** Priority Documents

It is not uncommon that WIPO fails to provide us with priority documents in a 371 filing. Applicants are not under obligation to provide priority documents in this national stage because they have already done so with WIPO. There are two ways to get these documents into IFW.

1. Contact the SPRE shop and request the documents. They will probably ask you to get them yourself by method 2 below or you will wait for WIPO to get around to sending them.
2. Get them from EPO online File Inspection.
  - a. Got to the following URL - <http://www.epoline.org/>
  - b. In the upper left, follow the link to "Register Plus" which takes you to the search screen.
  - c. In the search box, put in the application number of publication number making sure that you follow the correct format indicated and that you are looking in the correct database.
  - d. When your patent (application) comes up select "All Documents" from the menu on the left.
  - e. Find the priority document(s) and check their boxes, then use the download link for the selected document(s).
  - f. When the dialog window comes up, select open to open the document(s) in acrobat. You can print your document(s) now, probably to the group printer so you don't waste your time.
  - g. Submit the priority document(s) for scanning. Make sure that you use the Orange routing sheets and put them in the scanning bin.

Bear in mind the following caveat - The images database can be accessed during their office working hours only. These are: Monday to Friday (except public holidays), 08.00 to 18.00 hrs CET. You can, however, continue to search bibliographic, patent family and legal status data.

Jon P. Weber  
SPE 1657  
571-272-0925  
Rem-03A81